Ueber

die Reductionsfähigkeit der Bacterien

einschliesslich der Anaërobien.

Inaugural-Dissertation

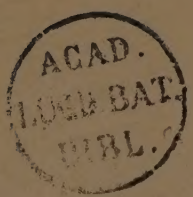
zur Erlangung der Doctorwürde

der medicinischen Facultät der Universität Tübingen

vorgelegt von

Alfred Wolff

aus Berlin.



Tübingen 1901.

Braunschweig
Druck von Albert Limbach G. m. b. H.

Gedruckt mit Genehmigung

der medicinischen Facultät der Universität Tübingen.

Referent: Professor Dr. v. Baumgarten.

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Ehrlich hat den Satz ausgesprochen: Die Reductionsfähigkeit ist eine Fundamentaleigenschaft des lebenden Protoplasmas. Die Richtigkeit dieses Ausspruches auch für die Bacterien ist durch zahlreiche Arbeiten dargelegt worden, deren vollständige Aufzählung hier unterlassen werden kann, da sich an anderer Stelle [23] eine genügende Zusammenstellung der über diesen Gegenstand vorhandenen Literatur findet.

Die meisten Autoren bedienten sich zum Nachweise der Bacterienreductionen der Farbstoffanalyse, zuerst wohl Helmholtz [1], der 1843 Fäulnissvorgänge, die sich dem Geruche noch entzogen, mittelst der Entfärbung von Lackmustinctur nachwies. Einige haben die Reductionswirkung auf andere Weise festgestellt. Ihre Versuche ergänzen die mittelst Farbstoffanalyse ausgeführten. Gayon und Dupetit [2] wiesen die Reduction der Nitrate in Nitrite unter NH_3 Entwickelung nach und schrieben diese Processe den Anaërobien zu. Heraeus [3] fand bei einzelnen Bacterien (Bac. prodigiosus, Bac. anthracis, Spirillus Finkler, Staphylococcus citreus) in den Cultursubstraten mittelst der Jodzinkamylumreaction salpetrige Säure, womit der Nachweis eines Reductionsprocesses erbracht war.

Die Mehrzahl der Untersucher unternahm die Arbeit in der Hoffnung, mittelst der Farbstoffanalyse brauchbare diagnostische Merkmale besonders für die Unterscheidung von Typhus- und Colibacillen zu gewinnen. Doch haben einzelne Forscher aus diesen Untersuchungen noch weitere Schlussfolgerungen gezogen. So glaubte Pöhl [10], der die Ptomaine für ein Reductionsproduct der Eiweisskörper hält, in der Reductionskraft der Bacterien ein Mittel zu besitzen, um die Fähigkeit der Bacterien zur Bildung von Ptomainen festzustellen. Liborius [11] geht von der Thatsache aus, dass bei den meisten Krankheiten der Kampf zwischen Körperzellen und Bacterien sich nicht an Stellen abspielt, wo reichliche Mengen freien Sauerstoffes vorhanden sind (richtiger müsste es heissen: relativ locker gebundenen Sauerstoffes), sondern an Stellen des Sauerstoffmangels. Er hält daher ein geringes Sauerstoffbedürfniss der pathogenen Bacterien für die beste Ausrüstung zum Kampfe derselben mit dem thierischen Körper. Wie später noch aus-

führlich gezeigt werden soll, ist es für die Bacterien als ebenso günstig anzusehen, wenn sie zwar ein grosses Sauerstoffbedürfniss haben, dafür aber auch mit einer starken Affinität zum Sauerstoff begabt sind, die grösser ist, als die der Körperzellen, oder was dasselbe sagt, wenn sie reductionskräftig sind.

Es ist als ungünstig für Bacterien zu erachten, wenn sie mit grossem Sauerstoffbedürfniss an Stellen des Körpers gerathen, an denen Sauerstoffmangel herrscht. Der „Kampf um den Sauerstoff" scheint in dem vielgestaltigen Bilde des Kampfes der Körperzellen mit den Bacterien einer der bewegenden Factoren zu sein.

Alle diese Theorien können erst festen Boden bekommen, wenn es gelingt, die Reductionskraft der Bacterien quantitativ zu messen. Es ist zwar möglich, sich von ihr ein ungefähres Bild zu machen, wenn man beobachtet, ob die Bacterien schwer oder leicht reducirbare Farbstoffe entfärben, d. i. reduciren. Ehrlich [12] hat eine Methode angegeben, mit der es möglich sein würde, die Reductionskraft zahlenmässig zu messen, wenn die nothwendigen Messungen seitens der Chemiker schon vorliegen würden. Reducirt z. B. ein Bacterium den Farbstoff A noch, den etwas schwerer reducirbaren Farbstoff B nicht mehr, so müsste seine Reductionskraft dazwischen liegen. Ein Farbstoff ist um so schwerer zu reduciren, je mehr Wärme er bei der Reduction verbraucht, d. h. latent werden lässt resp. bei der Oxydation (Verküpung) wieder abgiebt. Beide Wärmemengen lassen sich messen und giebt ihre Grösse den Maassstab für die Reductionskraft, doch sind, wie gesagt, die Messungen noch nicht ausgeführt.

Es ist wahrscheinlich, dass beim allmählichen Ausbau dieser Methode manche biologische Aufklärung zu erwarten sein wird. Doch kann die Methode keine exacte im strengen Sinne genannt werden, weil zwei Fehlerquellen sich nicht ausschalten lassen. Sauerstoffbedürfniss und Reductionskraft sind bei den Bacterien keine Begriffe, die zu einander in einem unveränderlichen Verhältnisse stehen. So hat z. B. Müller [5] gezeigt, dass der Milzbrandbacillus, der bei Luftabschluss im Stichcanal ausserordentlich reductionsschwach ist, bei Luftzutritt in Strichcultur auffallenderweise stärkere Reductionskraft zeigt. So hat also der Milzbrandbacillus die Eigenschaft, nur bei gutem Wachsthum in Folge Luftzufuhr eine Reduction auszuführen, die ihm bei Luftabschluss, wo es teleologisch für die Bacterien viel wichtiger wäre, nicht möglich ist.

Die zweite Schwierigkeit besteht darin, dass die Bacterien sich untereinander nicht nur durch eine verschiedene Reductionskraft (quantitativ) unterscheiden, sondern die einzelnen Bacterien einzelne Farbstoffe, die an sich schwerer reducirbar sind (und bei deren Oxydation

eine höhere Wärmemenge frei wird), dennoch leichter reduciren. Es wird auf diesen Punkt, der für die differential-diagnostischen Schlüsse aus der Farbenanalyse von grösster Bedeutung ist, später noch näher eingegangen werden, hier sei nur erwähnt, dass nach Müller [5] Cholera-spirillen das chemisch leichter reducirbare Methylenblau nicht reduciren, während sie Lackmus reduciren.

Die Wahl des Farbstoffes ist bei diesen Versuchen von grosser Bedeutung. Der Farbstoff muss wasserlöslich sein und verküpbar.[1] Leichte Reductionsfähigkeit ist nicht Bedingung, da schwer reducirbare Farbstoffe verwandt werden können, um maximale Reductionskräfte der Bacterien zu erkennen.

Die Färbung organischer Kohlenstoffverbindungen ist durch das Vorkommen bestimmter, ungesättigter Gruppen bedingt. Sie vermögen noch Wasserstoff (meist 2 Atome) aufzunehmen, das entstehende Product ist farblos (Leukoproduct). Durch Oxydation lässt sich der Farbstoff meist wieder regeneriren.

Die Farbstoffe, die am häufigsten verwendet wurden, erweisen sich bei näherer Prüfung meist als ungeeignet. Nach Roszaheguyi [13] wirkt besonders entwickelungshemmend Vesuvin, Gentianaviolett, Methylviolett, Tinctura carmesina. Diese Stoffe sind selten angewendet; nach Cahen [6] und Sommaruga [8] ist auch Methylenblau schädlich, ein Befund, den ich für Milzbrand- und Cholerabacterien bestätigen kann (cf. Protocoll S. 14).

Am meisten wurde von früheren Untersuchern indigosulfosaures Natron, Lackmus und Rosolsäure verwandt.

$$C_6H_4 \begin{<} \begin{matrix} NH \\ CO \end{matrix} \end{> C = C \begin{<} \begin{matrix} NH \\ CO \end{matrix} \end{> C_6H_4$$ — Indigblausulfosäure.

$$C_6H_4 \begin{<} \begin{matrix} N \\ | \\ C(OH) \end{matrix} \end{> CH - CH \begin{<} \begin{matrix} N \\ | \\ C(OH) \end{matrix} \end{> C_6H_4$$ — Indigweiss.

Lackmusfarbstoff: Constitution unbekannt. (Leukoproduct).

$$C_6H_3(CH_3) \begin{<} \begin{matrix} C \\ | \\ O \end{matrix} \end{< \begin{matrix} C_6H_4OH \\ C_6H_4OH \end{matrix}$$ — Rosolsäure.

$$C_6H_3(CH_3) \begin{<} \begin{matrix} CH \\ | \\ OH \end{matrix} \end{< \begin{matrix} C_6H_4OH \\ C_6H_4OH \end{matrix}$$ — Leukorosolsäure.

Indigosulfosaures Natron ist aus mehreren Gründen gar nicht oder nur mit Einschränkung verwerthbar, wenn es auch Spina [14], Kitasato und Weyl [15] verwendet haben.

---

[1]) d. h. dass aus dem Leukoproduct durch den Luftsauerstoff der ursprüngliche Farbstoff wieder hergestellt wird.

Es ist in sämmtlichen Nährböden nicht haltbar, sondern geht in einen farblosen Körper über, nach Cahen in Bouillon, Gelatine und Agar dem Licht und der Luft ausgesetzt, in 9, 11, 17 Tagen, bei Lichtabschluss in 15 und 21 Tagen. Müller [5] und Smith [16] schlossen aus diesem Grunde das indigosulfosaure Natron von ihren Versuchen aus. Das entstandene Product ist nicht regenerationsfähig; da aus Indigo auch durch Oxydation ein farbloses Product entstehen kann (cf. Zeitschr. f. Hygiene Bd. 8 S. 45), so liegt diese Möglichkeit vor und ist z. B. von Kitasato und Weyl [15] auch angenommen worden. Es ist klar, dass allein schon das Vorkommen der gleich aussehenden Oxydations- und Reductionsstufe die Anwendung zu Untersuchungen über Reduction unthunlich erscheinen lässt. So hat z. B. Kitasato [15], der über die Zersetzung des Stoffes keine Mittheilung macht, die begünstigende Wirkung, die der Stoff auf Anaërobien ausübt, dadurch zu erklären gesucht, dass er annimmt, das indigosulfosaure Natron habe durch Herstellung eines sauerstofffreien Nährbodens den Anaërobien günstige Daseinsbedingungen gewährt, während ich die Entfärbung auf Grund von Versuchen mit anderen Farbstoffen und in Uebereinstimmung mit Cahen [6] und Behring [4] für einen Reductionsprocess erklären möchte. Solche divergirende Ansichten werden durch diese doppelte Verbindungsfähigkeit des indigosulfosauren Natrons hervorgerufen.

In anderer Weise, aber auch in Folge der Doppelnatur der Stoffe, sind Lackmus und Rosolsäure ungeeignet, da Farbenwechsel sowohl durch Säurebildung der Culturen, als durch Reduction bewirkt wird. Dass es nun durchaus nicht leicht ist, diese beiden Vorgänge auseinander zu halten, zeigen die sich widersprechenden Angaben in der Literatur. Buchner [17] vindicirte Choleraspirillen, Typhus- und Faecesbacillen die Fähigkeit, Säure zu bilden. Als Indicator diente ihm Lackmus. Im Gegensatz zu ihm erklärte Behring [4] die Entfärbung des Lackmus als nicht durch Säurebildung bedingt. Sommaruga [8] stellte bei allen von ihm untersuchten Bacterien, darunter Cholera-, Typhus-, Milzbrandbacterien Alkalibildung fest. Die Frage der Säure- und Alkalibildung ist bisher noch nicht spruchreif, wahrscheinlich verlaufen beide Processe nebeneinander. Es ist vielleicht ähnlich zu denken, wie Ehrlich [12] beim Thierorganismus angenommen hat, dass bei dem Protoplasma Säurebildung und Alkalibildung, oder wenigstens Phasen höherer und niederer Alkalescenz mit einander abwechseln und dass „die Schöpfung des Sauerstoffs in die Phase der Alkalescenz, die des Verbrauchs in die Phase der Säuerung resp. Herabminderung der Alkalescenz“ zu verlegen ist. Durch den Hinweis auf die Kohlensäurebildung hat er diese Annahme wahrscheinlich gemacht

(l. c. S. 133) und da Hesse [18] für alle Bacterien einschliesslich der Anaërobien CO_2bildung nachgewiesen hat, kann man diese Anschauungen auf die Bacterien übertragen.

Jedenfalls empfiehlt es sich nicht, bis zur Klärung dieser Fragen Stoffe von doppelter Reactionsfähigkeit zu verwerthen. Lackmus hat ausserdem noch den Nachtheil, dass es ein Gemisch von Farbstoffen darstellt, die aus der Flechte Roccella tinctoria gewonnen sind, so dass man richtiger von den Lackmusfarbstoffen reden muss. Seine Constitution ist völlig unbekannt.

Der Einfluss der Nährböden auf die Farbstoffe ist nicht zu unterschätzen, wie die Entfärbung des indigosulfosauren Natrons in Bouillon, Gelatine und Agar zeigt. Die geringsten Reductionserscheinungen zeigt nach Müller [5] und Sommaruga [8] Bouillon, die stärksten Agar in Folge seiner Kohlehydratnatur. Doch finden sich auch entgegengesetzte Angaben; so zieht Spina [14] Agarnährböden vor, weil sie Methylenblau nicht von selbst entfärben. Diesen Befund versieht Smith [16] mit einem Fragezeichen; auch ich sah bei meinen Versuchen Reductionserscheinungen des Agars bei Methylenblau, die bei Gelatine nicht eintraten. Meine Befunde stimmen mit denen von Müller [5] und Sommaruga [8] völlig überein, so dass der von Behring [4] gegebene Rath, als Normalmethode für Reductionsuntersuchungen Agarnährböden zu verwenden, weil in Bouillon und Gelatine oft Reductionen übersehen werden (!), die in Agar ganz deutlich (!!) sind, nur mit der grössten Reserve aufgenommen werden darf.[1]

Zur Nachprüfung der vorliegenden Angaben verwendete ich Bouillon, Gelatine, Agar in Parallelversuchen; alle drei Nährböden wurden zu gleicher Zeit mit Farbstoff versehen und zu gleicher Zeit mit derselben Cultur inficirt. Um Fehler auszuschalten, wurden jeder Versuchsreihe gefärbte Controlröhrchen beigegeben, die unter absolut gleichen Bedingungen gehalten wurden, so dass man erkennen konnte, welche Reductionen durch den Nährboden bedingt wurden.

Eine Fehlerquelle der vorliegenden Arbeiten liegt darin, dass die Bacterien nicht von dem atmosphärischen Sauerstoff abgeschnitten wurden. Am meisten machte sich dieser Uebelstand bei Bouillon geltend, während die zähe Beschaffenheit des Agars und der Gelatine die Diffusion des Sauerstoffs erschwerte. Die Autoren berichten bei Bouillon von abwechselnd eintretenden Entfärbungen und Wiederherstellung des Farbstoffs, je nachdem zeitweilig die Reductionskraft der Bacterien grösser war, als der zugeführte Sauerstoff oder um-

[1]) Nach neu angestellten Versuchen scheinen beide Angaben richtig zu sein, da es Agar von grossem und von geringem Reductionsvermögen giebt.

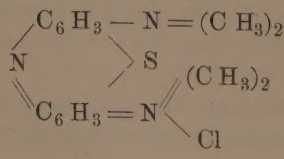
gekehrt mehr O hinzukam, als die Bacterien reduciren konnten. Will man nach den auf Seite 6 angegebenen Principien ein Maass für die Kraft gewinnen, mit der die Bacterien chemisch gebundenen Sauerstoff an sich reissen, so muss der atmosphärische Sauerstoff ausgeschaltet werden. Die Bacterien, die erst durch dargebotenen atmosphärischen Sauerstoff zu Reductionen befähigt werden (cf. S. 6), können nicht zu den primär reductionskräftigen gerechnet werden, weil diese Reduction erst einen secundären Lebensvorgang darstellt.

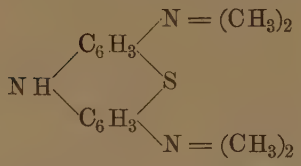
Es gelang, durch Ueberschichtung einer 3 bis 4 cm hohen Schicht von Paraffinum liquidum den diffundirenden Sauerstoff fast völlg fern zu halten, so dass reducirte Röhrchen von Saffranin oder Methylenblau (nachdem sie aus dem Brütschrank genommen waren) noch nach Wochen bis auf eine ca. 3 mm breite Schicht an der Berührungsstelle zwischen Leukoproduct und Paraffin farblos waren, obwohl die Leukokörper in alkalischer Lösung mit grosser Gier den Sauerstoff an sich reissen. Bei den festen Nährböden war der Abschluss noch besser, indem zwischen gefärbten Agar resp. Gelatine und Paraffin noch eine Schicht von Agar resp. Gelatine dazwischengegossen wurde.

Es war ferner von Wichtigkeit, dass der Nährboden möglichst wenig (physikalisch) absorbirten Sauerstoff enthielt. Dies wurde nach Möglichkeit dadurch zu erreichen gesucht, dass die Nährböden unmittelbar vor dem Gebrauch gekocht und gleich nach der Verwendung in oben angegebener Weise überschichtet wurden. Nach Hesse [12] entnehmen die Nährböden der atmosphärischen Luft um so mehr Sauerstoff, je alkalischer sie sind (er erwähnt aber nicht, ob es sich um physikalische Absorption oder um chemische Bindung handelt); bei der gewöhnlich angewendeten Alkalescenz jedoch in so geringer Menge, dass sie vernachlässigt werden kann.

Es wurden möglichst zahlreiche Farbstoffe zur Untersuchung benutzt. Um ein Urtheil zu ermöglichen, wie weit sie den oben gegebenen Anforderungen entsprechen, sollen ganz kurz ihre chemischen Haupteigenschaften charakterisirt werden. Die Concentration richtete sich nach ihrer Färbekraft, im Allgemeinen wurden die Nährböden mit so viel Farbstoff versetzt, dass sie einerseits noch durchscheinend blieben, andererseits aber die Eigenfarbe des Agars sich nicht mehr störend geltend machte.

Methylenblau (Tetramethylamidodiphenthiazimiumchlorid) geht durch Reductionsmittel leicht in seine Leukobase Tetramethyldiamidothiodiphenylamin über.



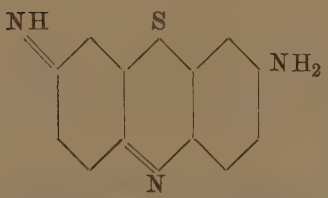


Es wurden 3 Reihen Parallelversuche vorgenommmen:

1 Tropfen
2 Tropfen einer 1procentigen Lösung } auf ca. 8 ccm Nährboden.
1 Tropfen einer $^1/_2$procentigen Lösung

Methylenblau ist als das Tetramethylderivat des Lauth'schen Violetts (Thionin) aufzufassen.

Thionin (Amidodiphenthiazim).

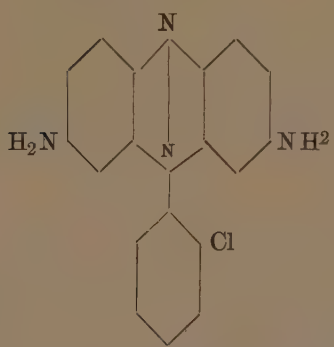


Durch Reduction geht es leicht in Paradiamidothiodiphenyl über, s. Bernthsen Annalen 230, S. 73 und 211. Verwendet wurde das in Wasser lösliche Chlorhydrat in gesättigter wässeriger Lösung. Bei Anwendung von 15 bis 18 Tropfen zeigt der Nährboden nur eine helle Färbung. Der Farbstoff sammelt sich in den hohen Partien des Nährbodens an.

Orceïn: Formel: $C_7H_7NO_3$ (?), amorphes braunes Pulver von schwach sauren Eigenschaften, löst sich in Alkalien mit violetter Farbe, wird durch Säuren gefällt.

Angewendet wurden 3 Tropfen einer 1procentigen Lösung.

Saffranin.



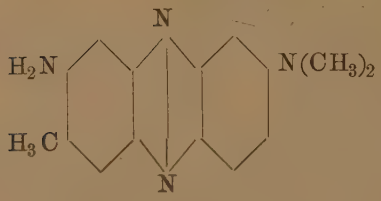
Durch Reduction gehen die Saffranine in Leukokörper über, die in saurer Lösung ziemlich beständig sind, in alkalischer Lösung fast augenblicklich in die ursprünglichen Farbstoffe übergeführt werden. Sie addiren bei der Leukobildung zwei Atome H.

Verwendet wurden 2 bis 3 Tropfen einer 1procentigen Lösung.

Methylviolett ist ein Gemenge, in welchem neben Hexamethylpararosanilin hauptsächlich Penta und Tetramethylrosanilin vorkommen.

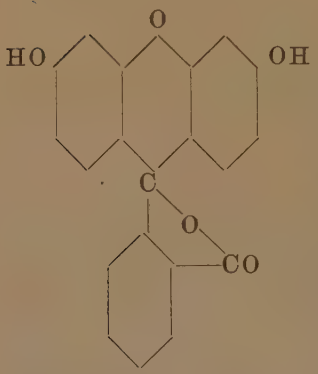
Verwendet 1 Tropfen einer 1procentigen Lösung.

Toluylenroth oder Neutralroth.



Alkoholische und ätherische Lösung fluorescirt stark. Durch Alkalien wird ein Umschlag in Gelb bewirkt.

2 Versuchsreihen: 3 Tropfen einer 2procentigen Lösung, 1 Tropfen einer 2procentigen Lösung.



Fluoresceïn: An Stelle von Eosin, dessen Moleküle noch durch 4 Bromatome beschwert sind, wurde Fluoresceïn verwendet. Es wird durch Reductionsmittel in das farblose Fluoresceïn übergeführt.

Eine gesättigte alkoholische Lösung wurde mit 3 Theilen Wasser versetzt. Von dieser Mischung wurden 4 Tropfen verwendet.

Orange G. $C_6H_5 - N = N - C_{10}H_4 = (HSO_3)_2$ (OH)

Verwendet wurden 6 Tropfen einer 1procentigen Lösung.

Methylgrün. (Chlormethylat des Hexamethylpararosanilinchlorid.)

$$(CH_3)_2N - C_6H_4 - C \begin{cases} C_6H_4N(CH_3)_2\,CH_3Cl \\ C_6H_4 = N(CH_3)_2 \\ \qquad\qquad Cl \end{cases}$$

Alkalihydrat im Ueberschuss bewirkt nach einiger Zeit Entfärbung. Angewendet wurden 5 Tropfen einer 1procentigen Lösung.

Anthrarobin. Kitasato und Weyl [15] brachen ihre Versuche ab, weil sich dieser Körper in Agar schwierig löst und sich leicht klumpig zusammenballt. Es ist ein Desoxyalizarin, welches unter Reduction leicht in Alizarin übergeht.

$$C_6H_4 \begin{cases} C(OH) \\ | \\ CH \end{cases} > C_6H_2(OH_2) + O_2$$

$$= C_6H_4 < \begin{matrix} CO \\ CO \end{matrix} > C_6H_2(OH)_2 + H_2O.$$

Von einer 80procentigen alkoholischen Lösung wurden 10 Tropfen angewandt. Sie ergaben eine helle Tönung des Nährbodens, doch trat starkes Nachdunkeln ein.

Indigosulfosaures Natron (s. S. 8).

Nach Nietzki [20] wird das Natronsalz der Disulfosäure des Indigo als Indigokarmin bezeichnet. Es ist daher auffällig, dass zahlreiche Autoren von indigosulfosaurem Natron und Indigokarmin als zwei Farbstoffen sprechen (z. B. Müller [5]).

Die Veränderungen durch den Sauerstoff der Luft wurden durch die eben erwähnte Versuchsanordnung ausgeschlossen. Störend blieb die Reduction, welche in den Nährböden erfolgte, doch zeigt der Körper andererseits so vortheilhafte Eigenschaften, wie das Fehlen jeder Wachsthumshemmung, dass man ihn mit der nöthigen Vorsicht (Controlröhren) anwenden darf. Es wurden mit indigosulfosaurem Natron vier Versuchsreihen angestellt: Zusatz von 2, 3, 5, 10, 15 Tropfen einer 1 procentigen Lösung.

Die Bacterien wurden so ausgewählt, dass sie sich gegen Sauerstoff möglichst different verhielten. Die Versuche zerfallen in

I. Versuche mit obligaten und facultativen Aërobien,

II. Versuche mit Anaërobien.

Um die 3 Parallelreihen (Agar, Gelatine, Bouillon) an möglichst zahlreichen Farbstoffen durchführen zu können, wurden nur wenige Bacterienarten zur Untersuchung benutzt. Als Vertreter der obligaten Aërobionten Choleraspirillen, bei denen nach Hesse [19] bei Sauerstoffabschluss das Wachsthum völlig sistirt, ferner der Tuberkelbacillus. Als Vertreter der Anaërobien: Die Bacillen des malignen Oedems und die Rauschbrandbacillen. Von facultativen Anaërobionten: Milzbrandbacillen, die bekanntlich zur Sporulation reichlich Sauerstoff brauchen. Von facultativen Anaërobionten wurden ausserdem noch Bacillus typhi und Bacillus coli untersucht, weil die Unterscheidung beider Bacillen bis jetzt immer noch grosse Schwierigkeiten macht, in der Hoffnung, event. auf diesem Wege ein differentiell-diagnostisches Merkmal zu finden. Die bisherigen, die genannten Bacillen betreffenden farbenanalytischen Befunde, die sich gegenseitig widersprechen, wurden mit der angegebenen Modification des Luftabschlusses nachgeprüft. Es wäre eine sichere Differenzirung auf farbenanalytischem Wege bei diesen beiden Arten um so mehr zu wünschen, als die bisher zur Differentialdiagnose verwendeten Methoden die Differenzirung noch immer schwierig erscheinen lassen.[1] Auch das Verhalten gegenüber dem Blutserum bei dem Widal'schen Verfahren ist nach Stern Coli- und Typhusbacillen gemeinsam. In Flügge's Mikroorganismen giebt Kruse eine Kritik der bisherigen Verfahren. „Alle

[1]) Anmerkung des Herausgebers. In der Unterschätzung der sonstigen Differentialkriterien zwischen Bact. typhi und Bac. coli geht der Herr Verfasser doch wohl etwas zu weit. Man kann auch ohne Farbenanalyse die genannten Bacterienarten meist recht gut unterscheiden. Aber willkommen ist ein neues Differenzirungsmittel gewiss.

anderen vielfach angepriesenen Verfahren, besonders diejenigen, die auf der Vorcultur in flüssigen Nährböden beruhen, wirken durchaus nicht zweckentsprechend, da sie das Ueberwuchern der verwandten Bacterien der Coligruppe begünstigen".

Versuchsprotocolle.

(NB.: Parallelreihen mit gleichen Ergebnissen wurden nicht angeführt.) Der verwendete Agar war Glycerinagar.

	Methylenblau					
	Bacterienart	Wachsthum	nach wieviel Stdn.	Reduction	bis zu welchem Stadium	Bemerkungen
Bouillon	Milzbrand	—		—		
	Typhus	+	18	+	bis blutwasserähnlicher Farbe	
	Coli	+	18	+	hellgrünlich bis blutwasserähnlich	
	Cholera	—		—		
	Controlröhre	—		—		
Gelatine	Milzbrand	—		—		
	Typhus	+		—		
	Coli	+	192	— +	nach 192 Stdn. beginnende Reduction	
	Cholera	—		—		
	Controle	—		—		
Agar	Milzbrand	—	36	+	bis auf 1 cm breiten grünen Streifen	s. Anm. 1
	Typhus	+	18	+	bis auf 1 cm breiten grünen Streifen	s. Anm. 1
	Coli	+	18	+	völlige Entfärbung	Gasbildung s. Anm. 1
	Cholera	—	40	+		s. Anm. 1
	Controle			+	bis auf einen 3 cm breiten Streifen	s. Anm. 1

	Methylenblau					
	Bacterienart	Wachsthum	nach wieviel Stdn.	Reduction	bis zu welchem Stadium	Bemerkungen
Anaërobien	Malignes Oedem	+	72—96	+	völlige Entfärbung	s. Anm. 2
	Rauschbrand	+	72—96	+	völlige Entfärbung	s. Anm. 2

Anmerkung 1. Nach 36 bis 40 Stunden von unten aus beginnende Entfärbung, die bis zur Rothrosafärbung, nicht bis zur Agareigenfarbe fortschreitet. Der Agar ist dabei durchsetzt von Gebilden, die man zuerst für Bacteriencolonien anspricht. Impfungen und Plattengiessversuche zeigen jedoch, dass es sich um diese nicht handelt. Der Agar enthält krystalloide Massen, die am meisten den verschiedenen Krystallisationsformen des Wassers ähnelten (Schneekrystalle).

Anmerkung 2. Agar wurde der Selbstreduction ausgesetzt, bis diese nicht weiter fortschritt, und dann erst die Culturen hinzugesetzt.

Malignes Oedem: Bacterienentwickelung. Nach 4 Tagen Vollendung der Entfärbung bis zur Eigenfarbe des Agars. Gasbildung mit explosivähnlicher Wirkung.

Rauschbrand: Bacterienentwickelung. Nach 3 bis 4 Tagen. Vergl. malignes Oedem.

Anmerkung 3. Methylenblau wirkt auf Milzbrand und Cholera entwickelungshemmend. Coli und Typhus zeigen Methylenblau gegenüber ungefähr dasselbe Reductionsvermögen, nur erregt Coli starke Gasbildung, während Typhus ohne jede Gasbildung wuchs. Dies Verhalten wird sich im Verlaufe der Versuchsreihe noch sehr oft finden; es ist bei der Versuchsanordnung (gefärbte Nährböden und Paraffinverschluss) viel constanter, als bei gewöhnlichen Culturen. Methylenblau[1] wird in Agarnährböden von selbst reducirt, in Folge dessen sind diese bei Methylenblauversuchen nicht zu verwerthen; doch kann man beobachten, dass die Röhrchen, die mit reductionskräftigen Bacterien beschickt sind, schneller reducirt werden, als die Controlröhrchen.

Thionin.

Thionin wirkt auch in grossen Mengen wenig entwickelungshemmend. Die Culturen verhalten sich in Agar und Bouillon annähernd gleich, während ihnen in Gelatine eine Reduction nicht gelang. Coli und Typhus reduciren Thionin fast gleichmässig, der einzige Unterschied liegt wieder in der Gasbildung. Selbstreduction in den Nährböden tritt nicht ein.

[1]) Siehe Anmerkung S. 9.

	Thionin					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Bouillon	Milzbrand	+	+	72—144	leichte Entfärbung	
	Typhus	+	+	72	völlige Entfärbung	
	Coli	+	+	72	völlige Entfärbung	
	Cholera	+	+	72 144	schwache Entfärbung völlige Entfärbung	
	Controle	—	—			
Gelatine	Milzbrand	—	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	—			Gasbildung
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			Ansammlung des Farbstoffes in der oberen Hälfte
Agar	Milzbrand	+ (schwach)	+	72 144	leichte Entfärbung völlige Entfärbung	
	Typhus	+	+	72	völlige Entfärbung	
	Coli	+	+	72	völlige Entfärbung	Gasbildung
	Cholera	+	+	72	etwas stärker wie Milzbrand	
	Controle	—	—			Ansammlung des Farbstoffes in der oberen Hälfte
Anaërobien	Malignes Oedem	+	+	72	völlige Entfärbung	Gasbildung
	Rauschbrand	+	+	72	völlige Entfärbung	Gasbildung

	Orceïn					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Bouillon	Milzbrand	—	—			
	Typhus	+	+ +	24 72	bis hellbraun lila völlige Entfärbung	
	Coli	+	+ +	24 144 336	hellbraun lila hell lila völlige Entfärbung	Entärbung schwächer, wie Typhus
	Cholera	+	+	30	leichte Entfärbung	
	Controle	—	—			
Gelatine	Milzbrand	—	—			
	Typhus	—	—			
	Coli	+	—			Gasbildung
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			
Agar	Milzbrand	+	?			nach 14 Tagen Farbenton etwas heller
	Typhus	+	+	48 72	bis hell lila völlige Entfärbung	
	Coli	+	+	48 120	bis hell lila völlige Entfärbung	Gasbilldung, Entfärbung schwächer, wie Typhus
	Cholera	+ (schwach)	—			
	Controle	—	—			

Bei Orceïn zeigt sich wieder, wie bei Thionin, dass die Bacterien in Gelatine am wenigsten fähig sind, Reductionen auszulösen, während Agar und Bouillon sich wieder fast gleich verhalten. Orceïn wirkt nur wenig entwickelungshemmend. Bac. typhi reducirt Orceïn deutlich stärker, als Bac. coli, doch ist kein absolutes Maass anzugeben, sondern die Stärke nur an gleichzeitig angestellten Parallelversuchen zu ersehen. Bac. coli bildet auch wieder Gas.

	Saffranin					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Bouillon	Milzbrand	—	—			
	Typhus	+	+	24 72	beginnende Aufhellung völlige Entfärbung	
	Coli	+	+	48	völlige Entfärbung	Bei 3 Tropfen trat Reduction nicht mehr ein
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			
Gelatine	Milzbrand	+	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	—			Gasbildung
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			
Agar	Milzbrand	+ (schwach)	—			
	Typhus	+	+	96	schwache Aufhellung	
	Coli	+	+	48 96	schwache Aufhellung völlige Entfärbung	Gasbildung, bei 3 Tropfen keine Reduction mehr
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			

Auch das Saffranin hindert wenig die Bacterienentwickelung; in Gelatine kam keine Reduction zu Stande. Coli reducirt Saffranin deutlich stärker, als Typhus. Bemerkenswerth ist, dass die Reduction ausblieb, wenn 3 Tropfen S. dem Nährboden zugesetzt werden.

	Methylviolett					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Bouillon	Milzbrand	—	—			
	Typhus	+	+	120—140	helllila bis hellblau	
	Coli	—	—			
	Cholera	—	—			
	Controle	—	—			
Gelatine	Milzbrand	—	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	—	—			
	Cholera	+ (schwach)	—			
	Controle	—	—			
Agar	Milzbrand	+	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	+	192 312	helllila völlige Entfärbung	Gasbildung
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			

Methylviolett wirkt besonders in Gelatine und Bouillon stark entwickelungshemmend. Es ist ausserordentlich schwer reducirbar.

Coli- und Typhusbacillen verhalten sich in Agar und Bouillon verschieden.

	Neutralroth					
	Bacillenart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stund.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Bouillon	Milzbrand	+ (schwach)	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	+	48	völlige Entfärbung	durch Schütteln mit Luft Wiederkehr der Färbung und Fluorescenz
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			
Gelatine	Milzbrand	+	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	—			Gasbildung
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			
Agar	Milzbrand	+	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	+	48 96	grünlich gelbrothe Fluores. völl. Entfärb.	Gasbildung
	Cholera	+ (schwach)	—			
	Controle	—	—			
Anaërobien	Malignes Oedem	+	+	96	schwache Fluorescenz, z. Th. in völl. Entfärbung übergegangen	

Neutralroth hindert die Entwickelung der Bacterien gar nicht, es wäre in dieser Beziehung ein idealer Farbstoff, doch ist er sehr schwer reducirbar, so dass nur Bact. coli und die Anaërobien die Reduction vollbringen, während Bact. typhi den Farbstoff gar nicht verändert.

Es bildet dies eine so vollständige Bestätigung der Rothberger'schen Befunde, dass es verwunderlich ist, dass diese Thatsachen noch nicht für praktische Zwecke verwerthet worden sind.

In dem längeren Zeitraum, den diese Arbeit in Folge ihrer Verwerthung als Dissertation hat ungedruckt liegen müssen, ist diese Frage in vollen Fluss gekommen. Ausser einer von mir erschienenen vorläufigen Mittheilung [25] hat Scheffler [26] diesbezügliche umfangreiche Untersuchungen veröffentlicht, die die Richtigkeit der Angaben für die verschiedensten Colistämme bestätigten.

Wir haben es hier mit einer Methode zu thun, die mit gutem Recht für die Differentialdiagnose zwischen Typhus- und Colibacterien empfohlen werden kann. Zum Beweise, wie weit die Uebereinstimmung unserer vollständig von einander unbeeinflussten Arbeiten geht, sei folgender Passus der Scheffler'schen Arbeit, die sich auf meine vorläufige Mittheilung im Centralblatt für Bacteriologie Bd. 27, No. 25 bezieht, erwähnt: „In der soeben während der Drucklegung in diesem Centralblatt erschienenen vorläufigen Mittheilung von A. Wolff: ‚Zur Reductionsfähigkeit der Bacterien', die auch unsere gemeinsame Arbeit über Agglutination erwähnt, finde ich eine Ergänzung und Bestätigung meiner Versuche, die für mich ebenso erwünscht und werthvoll ist, wie unsere Arbeit für A. Wolff. Durch Wolff's Arbeit finden sowohl meine Folgerungen hinsichtlich der Brauchbarkeit des Neutralroths zur Erkennung des Bact. coli, als auch der weitergehende Schluss, dass wir jetzt Bacterien, die Neutralroth nicht nach 48 Stunden resp. bei nicht gasbildenden Stämmen nach 5 bis 6 Tagen unverändert lassen, von der Coligruppe wahrscheinlich ausschliessen dürfen, auch von anderer Seite eine Bestätigung.

Die Ansicht Wolff's über die Verwendbarkeit der farbenanalytischen Methode zur Unterscheidung von Bact. typhi und coli halte ich für unzweifelhaft richtig. Wir verwenden im hygienischen Institut schon seit längerer Zeit den angegebenen Neutralrothtraubenzuckeragar bei der Untersuchung von Fäces, Wasser etc."

Jeder, der sich mit der Differentialdiagnose von Bact. typhi und coli befasst hat, weiss, wie werthvoll hier ein neues diagnostisches Hilfsmittel ist. Das Urtheil Kruse in Flügge's Mikroorganismen über die bestehenden Methoden ist S. 13 citirt worden.

Nährboden und Impfung.

Methode: Rothberger hat eine complicirte Methode angegeben, um eine Bacterienschüttelmischung zu erhalten. Es hat sich gezeigt, dass Strichculturen wegen der schnelleren Herstellung vorzuziehen sind.

Die Entfärbung findet in Bouillon und Agar statt, nicht in Gelatine, entsprechend dem auch bei den anderen Farbstoffen von den Bacterien beobachteten Verhalten. Mit der verschiedenen Werthigkeit der Nährböden im Einklang steht Scheffler's Angabe, dass die Reduction in Zuckeragar besser stattfindet, als in gewöhnlichem Agar. Da in Folge seiner geringen Reductionsfähigkeit Neutralroth im Zuckeragar nicht der „Nährbodenreduction" unterliegt, ist gegen seine Anwendung hier nichts einzuwenden. Unsere Resultate wurden bei Verwendung des Glycerinagars des Tübinger pathologischen Instituts erhalten.

Menge des Farbstoffs.

Rothberger verwendete eine ziemlich concentrirte Farbstofflösung; Scheffler folgte ihm anfangs, vertauschte jedoch bald die relativ concentrirten Gemische mit weniger concentrirten, so dass er der von mir verwendeten und veröffentlichten Mischung nahe kam. [1 bis 2 Tropfen einer 2 procentigen Neutralrothlösung auf ein Reagenzröhrchen Agar = ca. 10 ccm, Wolff.]

= 0,25 g einer concentrirten Neutralrothlösung auf 100 ccm Agar.

Auch weiterhin dürfte sich die Verwendung wenig concentrirter Farbstoffnährbodenlösung empfehlen, da bei der starken Färbekraft des Neutralroth auch die beschriebenen Lösungen einen gesättigten Farbenton zeigen.

Für differential-diagnostische Untersuchungen möchte ich sehr die von mir gewählte und S. 10 beschriebene Luftsauerstoffabschliessung empfehlen, weil sie schnellere und sichere Resultate giebt. Wenn Scheffler selbst sagt, dass die Beeinträchtigung, welche die Wirkung der Colibacillen auf den gefärbten Nährboden durch Luftzutritt erfährt, durch kräftiges Wachsthum der Colibacterien überwunden werden kann, so thut man doch sicher gut, diese Schädlichkeit auszuschalten.

Nimmt man dazu, dass die Röhren sich im Stichcanal von unten nach oben entfärben, also von der der Luft abgekehrten Seite an, dass bei Luftzutritt schwankende Resultate eintreten (Scheffler), dass bei ihm und Rothberger Stichculturen keine Resultate gaben, während meine überschichteten Stichculturen dieselbe Entfärbung zeigten, wird man im Interesse der Sicherheit der Reaction der Luftabschliessung den Vorzug geben müssen.

Fluorescenz und Entfärbung.

Wer Rothberger's und Scheffler's Arbeit einerseits und meine andererseits vergleicht, wird bemerken, dass diese vorwiegend resp. allein vom Hervorrufen von Fluorescenz reden, während ich fast allein von Entfärbung sprach.

Es ist dies eine Folge der Versuchsanordnung, indem sich die Fluorescenz als eine Vorstufe der vollständigen Reduction, der Entfärbung, darstellt; und diese vollständige Reduction ist eine Folge des Luftabschlusses, ohne den die völlige Reduction nicht erreicht wird. Als beweisend hierfür ist anzusehen, dass die Fluorescenzerscheinung sich als directe Uebergangsstufe zur Entfärbung zeigt, dass es ferner gelingt, die Fluorescenz zu reconstruiren. Bei entfärbten Bouillonröhren gelingt es, durch vorsichtiges Schütteln mit Luft vor der Wiederherstellung des rothen Farbentones eine Fluorescenzstufe herbeizuführen.

Interessant ist es, dass auch alkoholische und ätherische Lösungen von Neutralroth Fluorescenz zeigen.

Fluoresceïn.

Um zu sehen, ob die interessanten Befunde, die Tappeiner an Infusorien, die er fluorescirendem Lichte aussetzte, gemacht hatte, auch bei Bacterien auftreten, wurde die Hälfte der geimpften Röhrchen im Lichte stehen gelassen und so der Wirkung fluorescirenden Lichtes ausgesetzt. Es fand sich jedoch in der Bacterienentwickelung kein Unterschied, nur die Anaërobien zeigten am Licht kein Wachsthum.

	Fluoresceïn					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Bouillon	Milzbrand	+ (schwach)	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	—			
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			
Gelatine	Milzbrand	+ (schwach)	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	—			Gasbildung
	Cholera	+ (schwach)	—			
	Controle	—	—			

	Fluoresceïn					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Agar	Milzbrand	+ (schwach)	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	—			Gasbildung
	Cholera	+ (schwach)	—			
	Controle	—	—			
Anaërobien	Malignes Oedem	+	+	96	völlige Entfärbung	Gasbildung
	Rauschbrand	+	—			Gasbildung
	dieselben im Licht gehalt.	—	—			

Fluoresceïn wirkt entwickelungshemmend auf Milzbrand und Cholera, es ist sehr schwer zu reduciren, nur malignes Oedem bringt die Reduction zu Stande.

	Orange					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Bouillon	Milzbrand	+ (schwach)	—			
	Typhus	+	+ ?	240	schwache Aufhellung	
	Coli	+	—			
	Cholera	+ (schwach)	—			
	Controle	—	—			
Gelatine	Milzbrand	+	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	—			Gasbildung
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			

	Orange					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Agar	Milzbrand	+	—			
	Typhus	+ (schwach)	—			
	Coli	+	—			Gasbildung
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			
Anaërobien	Malignes Oedem	+	+	?	völlige Entfärbung	

Methylgrün.

Bouillon.

Milzbrand: Bacterienentwickelung. Keine Entfärbung.
Typhus: Bacterienentwickelung. Nach 5 Tagen völlige Entfärbung.
Coli: Bacterienentwickelung. Nach 5 Tagen völlige Entfärbung.
Cholera: Schwache Bacterienentwickelung. Keine Entfärbung.
Controle: Unverändert.

Gelatine.

Milzbrand: Schwache Bacterienentwickelung. Keine Entfärbung.
Typhus: Bacterienentwickelung. Keine Entfärbung.
Coli: Bacterienentwickelung, Gasbildung. Keine Entfärbung.
Cholera: Bacterienentwickelung. Keine Entfärbung.
Controle: Unverändert.

	Methylgrün					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Bouillon	Milzbrand	+ (schwach)	—			
	Typhus	+	+	120	völlige Entfärbung	
	Coli	+	+	120	völlige Entfärbung	
	Cholera	+ (schwach)	—			
	Controle	—	—			

	Methylgrün					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Gelatine	Milzbrand	+ (schwach)	—			
	Typhus	+	—			
	Coli	+	—			Gasbildung
	Cholera	+	—			
	Controle	—	—			
Agar	Milzbrand	+ (schwach)	—			
	Typhus	+	+	120 264	leichte Aufhellung, völlig. Entfärbung	
	Coli	+	+	120	völlige Entfärbung	Gasbildung
	Cholera	+ (schwach)	—			
	Controle	—	—			
Anaërobien	Malignes Oedem	+	+		völlige Entfärbung	Gasbildung

	Anthrarobin					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Bouillon	Milzbrand	—	—			
	Typhus	—	+		leichte Aufhellung	
	Coli	—	+		leichte Aufhellung	
	Cholera	—	—			
	Controle	—	—			

	Anthrarobin					
	Bacterienart	Wachsthum	Reduction	nach wieviel Stdn.	bis zu welchem Grade	Bemerkungen
Gelatine	Milzbrand	—	—			Der Farbstoff hat sich in allen Röhrchen zu einer ringförmigen Schicht zusammengezogen
	Typhus	+	—			
	Coli	+	—			
	Cholera	—	—			
	Controle	—	—			
Agar	Milzbrand	—	—			
	Typhus	+	+	144	fast völlige Aufhellung	
	Coli	+	+	144	völlige Aufhellung	Gasbildung
	Cholera	—	—			
	Controle	—	—			
Anaërobien	Malignes Oedem	—	—			
	Rauschbrand	—	—			

Anthrarobin wirkt entwickelungshemmend auf Milzbrand, Cholera und die Anaërobien (malignes Oedem und Rauschbrand), die in Folge dessen ihre Reductionskraft nicht bethätigen konnten. Chemisch ist es leicht zu reduciren; von Bacterien gelingt die Reduction Coli und Typhus.

Indigosulfosaures Natron.

Wegen der früher angeführten Bedenken sollen die mit indigosulfosaurem Natron angestellten zahlreichen Versuche hier nicht protocollirt werden.

Es sei nur erwähnt, dass sämmtliche Bacterien ausserordentlich üppig wuchsen, dass man an eine Beförderung des Bacterienwachsthumes denken kann, wie sie Behring[4] für die Anaërobien beobachtet hat. Die Selbstreduction der Controlröhren schreitet meist nur bis zur Bildung eines schmutzig grünen Farbstoffes vor, während alle angewandten Bacterien die Reduction weiter ausführten. Wegen der Schwierigkeiten der Abgrenzung der Nährböden und der Bacterienreduction ist der Stoff für derartige Untersuchungen nahezu werthlos.

Da, wie schon S. 6 erwähnt wurde, die bei der Oxydation der Farbstoffe freiwerdende Wärme bis jetzt noch nicht gemessen worden ist, wurde versucht, durch leichter auszuführende Untersuchungen sich ein Bild von der Reductionskraft der Bacterien zu verschaffen.

Die reducirten Farbstoffe wurden durch hypermangansaures Kali ($KMnO_4$), H_2O_2 Wasserstoffsuperoxyd und chlorsaures Kali ($KClC_3$) oxydirt; die Menge des oxydirenden Mittels in 1 $^0/_{00}$ Lösung, die hinreichte, um Wiederkehr der Farbe zu erzielen, wurde gemessen und so eine titrimetrische Messung ermöglicht. (Bouillonversuche).

Um den Luftsauerstoff auszuschalten, wurde die Spitze der Pipette durch die sperrende Paraffinschicht hindurchgeführt.

Die Methoden ergaben jedoch nur ungenaue Resultate wegen der nur allmählich und nicht gleichmässig eintretenden Oxydation der verschiedenen organischen Verbindungen.

Als weitere Schwierigkeit kommt hinzu, dass es bei der Titrirung nicht möglich ist, den ursprünglichen Farbenton wieder herzustellen. Um doch ein gewisses Maass für die Reductionsfähigkeit zu bekommen, wurde stark übertitrirt und es gelang den Bacterien in der That, in einigen Fällen erneute Reduction trotz des antiseptischen Charakters der Titrirlösungen herbeizuführen. Es seien einige Beispiele angeführt:

Bact. coli, das Methylenblau reducirt hatte, wird mit 1,2 ccm einer 1procentigen $KMnO_4$lösung versetzt. Nach 4 Tagen völlige Reduction. Bei Zusatz von 3,9 ccm blieb die Reduction aus.

Bact. coli, das Methylenblau reducirt hatte, wird mit 15 Tropfen H_2O_2 versetzt. Nach 4 Tagen völlige Reduction.

Bact. typhi, das Methylenblau reducirt hatte, wird mit 15 Tropfen H_2O_2 versetzt, Reduction blieb aus. Mit 0,3 ccm einer 1procentigen $KMnO_4$lösung versetzt, nach 4 Tagen völlige Reduction, diese bleibt aus bei Zusatz von 1 ccm $KMnO_4$.

Bei Saffraninröhren sind die Resultate analog.

Auch hier zeigt sich Coli wieder reductionskräftiger.

Für die entwickelungshemmenden Eigenschaften der Farbstoffe ergiebt sich folgende Tabelle.

Es wird gehemmt (am Wachsthum fast oder völlig gehindert).

Milzbrandbac.: durch Methylenblau, Thionin (Gelatine), Orceïn (Bouillon und Gelatine), Saffranin (Bouillon), Methylviolett (Bouillon und Gelatine), Anthrarobin, Fluoresceïn (stark abschwächend).

Bact. typhi: Orceïn (Gelatine).

Bact. coli: Methylviolett (Gelatine und Bouillon).

Bact. cholerae: Methylenblau, Methylviolett (Bouillon), Anthrarobin, Fluoresceïn (abschwächend).

Bac. des malign. Oedems: Anthrarobin.

Bac. des Rauschbrands: Anthrarobin.

Name der reducirten Stoffe	Name der reducirenden Bacterienarten (nach der Stärke der Reduction angeführt)	
Methylenblau:	I. Coli, Typhus, Anaërobien	
Orceïn:	I. Typhus, II. Coli	
Thionin:	I. Coli, Typhus II. Cholera, Milzbrand	
Saffranin:	I. Coli, Typhus,	III. Cholera, Milzbrand.
Methylviolett:	I. Typhus, Coli,	
Neutralroth:	I. Anaërobien, Coli (mal. Oedem, Rauschbrand),	
Methylgrün:	I. Coli, Typhus, mal. Oedem,	
Anthrarobin:	I. Coli, Typhus,	
Fluoresceïn:	Malignes Oedem,	
Orange:	Malignes Oedem,	

Man kann die untersuchten Bacterien nach ihrer Reductionsfähigkeit in 3 Klassen theilen.

I. Sehr reductionskräftig. Anaërobien, besonders Mal. Oedem.
II. Reductionskräftig. Coli, Typhus.
III. Reductionsschwach. Milzbrand, Cholera.

Ad III ist zu bemerken, dass die bei Bac. anthracis und Spir. cholerae sich zeigende Reductionsunfähigkeit z. Th. auf der Versuchsanordnung des Luftabschlusses beruhte, die ihnen keine günstigen Wachsthumsverhältnisse setzte, worauf schon an mehreren Stellen hingewiesen wurde. Man kann sie aber doch mit gutem Recht als reductionsschwach bezeichnen, weil sie auch in den Fällen, wo sie gutes Wachsthum zeigten, geringe Fähigkeit zu Reductionen bewiesen haben und weil ihnen weiter die Möglichkeit mangelt, bei Luftabschluss den ihnen zum Wachsthum nöthigen Sauerstoff aus dem Nährboden frei zu machen.

Es ist die Frage vielfach discutirt worden, ob die Reduction durch directe Arbeitsleistung der Bacterienzelle oder durch Stoffwechselproducte der Bacterien hervorgerufen wird. Auf dem ersteren Standpunkt stehen Cahen [6], Spina [14], Rothberger [9], auf letzterem Roszaheguyi [13], Baginsky [22] und Müller [5]. Die Frage ist heute noch als ungelöst zu betrachten, doch ist anzunehmen, dass nach Analogie des Protoplasmas der Zelle auch den Bacterien directe Reduc-

tionswirkungen zuzuschreiben sind. Dagegen ist es fraglich, ob die ganze sichtbare Reduction den Bacterien zuzuschreiben ist und ob sie nicht indirect durch Stoffwechselproducte bewirkt wird.

Wenn ich mich jetzt zu den praktischen Ergebnissen dieser Untersuchungen wende, so muss vorausgeschickt werden, dass die oben aufgestellten 3 Gruppen sich zwar trennen lassen, dass aber innerhalb der 3 Gruppen wieder einzelne Bacterien für specielle Farbstoffe besonders reductionskräftig sind. Ehrlich [12] hat mit Recht darauf hingewiesen, dass ein Theil der in der Histologie üblichen Methoden auf „Reductionserscheinungen mit Election" beruhen. „So wird durch Osmiumsäure gerade die Markscheide geschwärzt, während Goldsalze durch den Achsencylinder, nicht aber durch das Mark reducirt werden, und Silbersalze wiederum Substanzen mehr indifferenter Natur, wie die Kittsubstanz, bräunen."

Diese qualitative Reductionskraft ist schon von Müller [5] behauptet, von Smith [16] dagegen bestritten worden. Nach meinen Ergebnissen glaube ich bestimmt für sie eintreten zu können und ermöglicht sie es gerade, Bact. typhi und coli von einander zu unterscheiden, da die farbenanalytischen quantitativen Unterschiede nicht gross genug sind, um auf sie eine sichere Differentialdiagnose begründen zu können. Während Coli- und Typhusbacterien bei den meisten Farbstoffen gleichmässig reduciren, wobei Bac. coli immer als etwas reductionskräftiger gelten muss, zeigt Bac. typhi für Orceïn deutlich eine grössere Reductionskraft, als Bac. coli.

Besonders wichtig für die Typhusdiagnose ist das Verhalten zu Neutralroth, das Bac. typhi nicht zu reduciren vermag, während es Bac. coli gelingt.

Die qualitative Reductionskraft erklärt auch manche scheinbare Widersprüche. So fand Cahen [6] die Angabe von Liborius [11], dass Bac. typhi ein facultativer Anaërobiont ist, mit seinen Versuchen unvereinbar, weil er Lackmus nicht reducirt hatte; das nicht nur quantitative, sondern auch qualitative (elective) Verhalten der Bacterien gegenüber Farbstoffen lässt aber durchaus die Möglichkeit zu, dass Bac. typhi als facultativer Anaërobiont Lackmus nicht reducirt, während andere facultative Anaërobionten die Reduction vollbringen.

Die Befunde bei den Anaërobien verdienen eine besondere Besprechung. Die Anaërobien nehmen bis jetzt nicht nur in der Bacteriologie, sondern auch in der Physiologie eine Stellung ein, die sie scharf von allen anderen Lebewesen scheidet. So schreibt Gottschlich in Flügge's Mikroorganismen: Während nämlich der Sauerstoff für alle Thiere und Pflanzen ein zum dauernden Bestand des Lebens absolut nöthiger Bestandtheil ist, vermag ein grosser Theil der Mikroorganismen

dieses wichtige Lebenselement dauernd zu entbehren. Weiter sieht er in der Thatsache des Lebens ohne freien Sauerstoff eine glänzende Bestätigung der Anschauung, welche als primäre Ursache des Lebens einen Spaltungsprocess ansieht und dem Sauerstoff nur eine secundäre Rolle beimisst.

Ein dauerndes Leben ohne Sauerstoff, ja sogar als conditio sine qua non des Lebens ein Fehlen von Sauerstoff, hat man nur für die Anaërobien angenommen. Bereits Pasteur hat aber das Irrige dieser Annahme erkannt und gezeigt, dass es auch für die Anaërobien kein Leben ohne Sauerstoff giebt. Wenn sie auch den freien Luftsauerstoff nicht verwerthen, so entziehen sie doch, um zu leben, ihren Nährsubstanzen den chemisch gebundenen Sauerstoff (Compt. rend., t. LXXX und: Études sur la bière).

Die oben mitgetheilten Untersuchungen weisen mit zwingender Nothwendigkeit darauf hin, dass die Anaërobien zum Leben Sauerstoff gebrauchen und sich also der Biologie aller Lebewesen anschliessen. Natürlich lässt sich die Thatsache nicht aus der Welt schaffen, dass die sogen. Anaërobien bei Anwesenheit von „freiem" Sauerstoff nicht zu wachsen vermögen. Aber diese Thatsache bringt an sich in unsere biologischen Begriffe keine Verwirrung; zeigen sich doch genug Analoga. So ist jedes Lebewesen auf eine gewisse Minimal- und Maximaltension des Sauerstoffs angewiesen; gehen doch Fische, die den absorbirten Sauerstoff des Wassers durch ihre Lebensthätigkeit freimachen, im Ueberfluss von Sauerstoff zu Grunde.

Alle Bacterien ohne Ausnahme brauchen Sauerstoff zu ihrem Leben, aber ein Theil von ihnen besitzt die Kraft, sich den Sauerstoff, der ihnen nicht frei dargeboten wird, aus dem Nährmaterial durch chemische Umsetzungen frei zu machen.[1] Die Anaërobien besitzen nach den vorliegenden Untersuchungen diese Eigenschaft in hohem Grade, da sie Farbstoffe reducirten, welche die anderen Bacterienarten nicht zu reduciren vermochten. Doch machen sie sich wahrscheinlich nur so viel Sauerstoff frei, wie sie zur sofortigen Oxydation brauchen, da freier Sauerstoff für sie giftig wirkt. Auch die Giftigkeit der eigenen Lebensproducte steht nicht ohne Analogie da, es sei hier nur an die Alkoholbildung durch Hefe erinnert.

Dass die Auffassung, die Anaërobien vermöchten ohne Sauerstoff zu leben, bis jetzt so häufig trotz Pasteur's klarer Darlegung des

[1]) Auch in den mit Farbstoff angestellten Versuchen entnehmen die Bacterien den Sauerstoff dem Nährboden und nicht dem Farbstoff. Denn dieser enthält in den meisten Fällen kein O (siehe Formeln) und wird erst indirect durch den bei der Sauerstoffbeschaffung der Bacterien frei werdenden nascirenden Wasserstoff entfärbt.

Sachverhaltes hat vertreten werden können,[1] ist um so verwunderlicher, als schon früher auch in deutschen Arbeiten einzelne Angaben, wenn auch ganz vereinzelt, gemacht worden sind, die deutlich den Widerspruch zeigen. So beobachteten Behring und Cahen durch Anaërobien Reduction von Lackmustinctur[2] und Hesse [8] wies gasanalytisch nach, dass die Anaërobien in reiner Wasserstoffatmosphäre Kohlensäure producirten.

Auch sei hier noch erwähnt, dass Verworn in seiner „Allgemeinen Physiologie" zu der Annahme gelangt, dass die sogen. Anaërobien die Fähigkeit haben, aus den Salzen von Alkalien Sauerstoff abzuspalten, wenn er auch für diese Annahme erst experimentelle Begründung fordert, die für die Thatsache der O-Abspaltung hiermit gegeben ist.

Folgerungen.

I. Die Bacterien können nach ihrer Reductionsfähigkeit eingetheilt werden in:

1. sehr stark reductionsfähige,
2. stark reductionsfähige,
3. schwach reductionsfähige.

II. Man muss scharf unterscheiden zwischen Sauerstoffbedürfniss der Bacterien und der Fähigkeit (Kraft), chemisch gebundenen Sauerstoff durch ihre grössere Affinität an sich zu ziehen.

III. Die Anaërobien bilden keine Ausnahme von den anderen Lebewesen, auch sie bedürfen Sauerstoff; der Unterschied ist ein rein quantitativer. Sie haben in hervorragendem Maasse die Fähigkeit, chemisch gebundenen Sauerstoff an sich zu ziehen. (Bestätigung der Pasteur'schen Auffassung.)

IV. Die Bacterien zeigen nicht nur quantitative, sondern auch qualitative Verschiedenheiten gegenüber den Farbstoffen [electives Verhalten].

V. Zur Differentialdiagnose zwischen Bac. coli und Bac. typhi ist besonders das Neutralroth zu verwerthen. Bei diesem Farbstoffe bewirkt Bac. coli erst Fluorescenz, dann Entfärbung, während Bac. typhi den Farbstoff unverändert lässt (ungefähr gleichzeitig mit und unabhängig von Rothberger und Scheffler festgestellt).

---

[1]) Anmerkung des Herausgebers. In meinem Lehrbuch der pathologischen Mykologie ist die Anaërobiose nicht als ein Leben ohne Sauerstoff, sondern nur als ein Leben ohne freien Sauerstoff, ganz im Sinne und unter Zugrundelegung der Pasteur'schen Auffassung behandelt worden.

[2]) Anmerkung. Allerdings waren eben die Resultate durch Anwendung von Lackmus (siehe S. 8) erzielt und deshalb nicht eindeutig.

VI. Zu Untersuchungen über die Reductionsfähigkeit der Bacterien eignet sich Agar und Bouillon, wenn man durch Controlversuche Täuschungen durch Selbstreduction der Nährböden ausschliesst. Gelatine hindert das Zustandekommen der Reduction meistens.

VII. Bei Versuchen über die Reductionsfähigkeit der Bacterien empfiehlt sich die Absperrung der atmosphärischen Luft. Durch diese Ausschaltung störender Nebenwirkungen wird es erst ermöglicht, eindeutige Resultate zu erhalten. Allerdings werden durch diese Versuchsanordnung Bacterien mit grossem Sauerstoffbedürfniss, aber geringem Vermögen, chemisch gebundenen Sauerstoff zu verarbeiten, an der Ausführung von Reductionswirkungen gehindert.

Zum Schlusse erfülle ich eine Pflicht der Dankbarkeit, wenn ich Herrn Prof. Dr. v. Baumgarten für die freundliche Unterstützung durch die Mittel des pathologischen Instituts und für sein jederzeit gezeigtes reges Interesse an dieser Arbeit, Herrn Assistenten Dr. Dietrich für bereitwillig ertheilte Auskünfte meinen ergebensten Dank ausspreche.

Literaturverzeichniss.

1. Helmholtz, (Lackmus) Ueber das Wesen der Fäulniss und Gährung: Archiv für Anatomie u. Physiologie 1843.
2. Gayon: Comptes rendus tome XCV.
3. Heraeus, Ueber das Verhalten der Bacterien im Brunnenwasser: Zeitschr. für Hygiene Bd. II.
4. Behring, Beiträge zur Aetiologie des Milzbrandes: Zeitschr. für Hygiene Bd. VII.
5. Müller, Fr., Ueber das Reductionsvermögen der Bacterien: Centralbl. für Bacteriologie Bd. XXVI, p. 51 u. 801.
6. Cahen, Ueber das Reductionsvermögen der Bacterien: Zeitschr. für Hygiene Bd. II, p. 386.
7. Lösener: Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt Bd. XI, p. 2.
8. Sommaruga, Ueber Stoffwechselproducte der Mikroorganismen: Zeitschr. für Hygiene Bd. XII.
9. Rothberger, Differentiell diagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährböden: Centralbl. für Bacteriologie Bd. XXIV u. XXV.
10. Poehl, Ueber einige biologisch-chemische Eigenschaften der Mikroorganismen im Allgemeinen und über die Bildung der Ptomaïne durch die Cholerabacillen im Speciellen: Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1886, I, p. 1159.
11. Liborius, Beiträge zur Kenntniss des Sauerstoffbedürfnisses der Bacterien: Zeitschr. für Hygiene Bd. I, p. 115.
12. Ehrlich, Das Sauerstoffbedürfniss des Organismus. Berlin 1885, Hirschwald.
13. Roszaheguyi, Ueber das Züchten von Bacterien in gefärbter Nährgelatine: Centralbl. für Bacteriologie Bd. II, p. 418.
14. Spina, Bacteriologische Versuche mit gefärbten Nährsubstanzen: Centralbl. für Bacteriologie Bd. II, p. 71.
15. Kitasato und Weyl, Zur Kenntniss der Anaërobien. Zeitschr. für Hygiene Bd. 8, p. 44.
16. Smith, Reductionserscheinungen bei Bacterien und ihre Beziehungen zur Bacterienzelle: Centralbl. für Bacteriologie Bd. XIX.
17. Buchner, Beiträge zur Kenntniss des Neapler Cholerabacillus: Archiv für Hygiene Bd. III.
18. Hesse, Ueber die gasförmigen Stoffwechselproducte beim Wachsthum der Bacterien: Zeitschr. für Hygiene Bd. XV, p. 17.

19. Hesse, Ueber den Einfluss der Alkalescenz des Nährbodens auf das Wachsthum der Bacterien: Zeitschr. für Hygiene Bd. XV, p. 183.
20. Nietzki, Chemie der organischen Farbstoffe.
21. Rosin, Eine Methode zur Bestimmung der reducirenden Kraft des Harnes etc.: Münch. med. Wochenschr. 1899.
22. Baginsky, Ueber Gährungsvorgänge im kindlichen Darmcanal: Deutsche med. Wochenschr. 1888.
23. Klett: Zeitschr. für Hygiene Bd. XXXIII, p. 137.
24. Köhler und Scheffler, Die Agglutination von Fäcalbacterien bei Typhus abdominalis durch das Blutserum: Münch. med. Wochenschr. 1900, No. 22.
25. Wolff, A., Zur Reductionsfähigkeit der Bacterien: Centralbl. f. Bacteriologie I. Abth., 1900, Bd. XXVII, No. 25.
26. Scheffler, W. (Jena), Das Neutralroth als Hilfsmittel zur Diagnose des Bacterium coli: Centralbl. f. Bacteriologie 1900, Bd. XXVIII, No. 6 u. 7.

Lebenslauf.

Verfasser dieser Arbeit wurde am 25. August 1877 zu Berlin geboren. Er besuchte von 1884 bis 1896 das Städtische Friedrichs-Gymnasium, das er Ostern 1896 mit dem Zeugniss der Reife verliess. Er studirte hierauf von Ostern 1896 bis Ostern 1898 in Berlin Medicin und legte dort am 9. Februar 1898 das Tentamen physicum ab. Das 5. Semester studirte er in Kiel, das 6. und 7. wieder in Berlin, das 8. und 9. in Tübingen. Das ärztliche Staatsexamen legte er Winter 1900/1901 in Tübingen ab.

Er hörte die Curse und Vorlesungen folgender Herren:

In Berlin: Engelmann, E. Fischer, Fritsch, Gerhardt, Goldscheider, Hertwig, Hirschberg, Fr. König, Köppen, Lassar, v. Leyden, Mendelsohn, J. Munk, Nagel, Olshausen, F. E. Schulze, Schwendener, Senator, Silex, H. Virchow, Waldeyer, Warburg.

In Kiel: Bier, Brandt, Döhle, Fischer, Heller, Klein, Quincke.

In Tübingen: v. Baumgarten, v. Bruns, Döderlein, Heidenhain, Hofmeister, v. Jürgensen, v. Liebermeister, Oesterlen, Schleich, Siemerling.

Als Famulus war er thätig:

Im Städtischen Krankenhaus Moabit, Abtheilung Prof. Goldscheider bei Dr. Brasch.

In der Königl. chirurgischen Poliklinik der Charité, Prof. F. König, Prof. Hildebrand.

In der Universitäts-Poliklinik, Abtheilung für Kinderkrankheiten und Abtheilung für Haut- und Geschlechtskranke, Prof. Senator.

In der Königl. Universitäts-Poliklinik für Haut- und Geschlechtskranke, Prof. Lesser.

Er arbeitete in den Laboratorien folgender Herren:

Prof. W. Flemming, Kiel, Anatomisches Institut.

Prof. O. Hertwig, Berlin, Biologisch-anatomisches Institut.

Prof. Fr. König und Prof. Hildebrand, Berlin, Laboratorium der chirurgischen Klinik der Charité.

Prof. v. Baumgarten, Tübingen, Pathologisches Institut.

Allen seinen verehrten Lehrern, besonders den letztgenannten, für die zahlreichen ihm gewordenen Anregungen, gestattet sich der Verfasser, seinen ergebensten Dank auszusprechen.